云 南 植 物 研 究 2003，25（6）：641～647
Acta Botanica Yunnanica

我国盾叶薯蓣居群遗传结构分析*

黄春洪，杭悦宇，周义锋，史德荣，郭可跃**

（江苏省中科院植物研究所（南京中山植物园）江苏省植物迁地保护重点实验室，江苏 南京 210014）

摘要：利用随机扩增多态DNA（RAPD）**标记，分析研究了中国**11**个盾叶薯蓣居群**82**个个体的遗传多样性与遗传结构，**15**个寡聚核苷酸引物扩增共得到**108**条带，其中**96**条为多态带，占**88.89%。Shannon**多样性指数（***I***）为**0.3093，**居群水平的变异从**0.1564**到**0.3098，**物种水平的**Nei**基因多样度（***h***）为**0.2499，**居群水平的变化范围为**0.1607**到**0.2137。**遗传变异分析表明，物种水平的基因分化系数**G_{st}**为**0.3415，**居群间的基因流**N_m**为**0.9641，**居群间遗传交换小。分子方差分析（**AMOVA）**表明，居群内变异为**68.96%，**地区间变异为**19.45%，**居群间变异为**11.58%。**聚类结果以长江为界，将盾叶薯蓣分为南北两个大类群。研究结果对盾叶薯蓣种质的迁地保护有重要意义。**

关键词：盾叶薯蓣；RAPD**；遗传多样性；遗传结构**

中图分类号：Q 943　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0253－2700(2003)06－0641－07

Population Genetic Structure of *Dioscorea zingiberensis* in China

HUANG Chun-Hong，HANG Yue-Yu**，ZHOU Yi-Feng，SHI De-Rong，GUO Ke-Yue

(*Institute of Botany*，*Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences*，*Jiangsu Provincial Key Laboratory for Plant Ex. Situ. Conservation*，Nanjing 210014，China)

Abstract：Genetic diversity and population genetic structure in 82 individuals from 11 wild and cultivated populations of *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. were studied by RAPD markers. 108 loci were indentified with 15 oligonucleotide primers，out of which 96 loci were polymorphic and account for 88.89% of total genetic diversity at species level. Shannon's indices of diversity（*I*）varied from 0.1564 to 0.3098，and Nei's gene diversity（*h*）varied from 0.1607 to 0.2137 at population level，with $I = 0.3093$ and $h = 0.2499$ at the species level，respectively. Genetic variance analysis showed the coefficient of gene differentiation is 0.3415 at species level，and the gene flow among populations of *D. zingiberensis* is 0.9641. Analysis of molecular variance（AMOVA）showed that the main genetic variance existed within population，which accounted for 68.96%，variance among regions and populations were only 19.45% and 11.58%，respectively. Clustering analysis grouped all the 11 populations into 2 major groups which can be separated by Yangtze river. The results have a guidance to the *ex. situ.* conservation of *D. zingiberensis* germplasm.

Key words：*Dioscorea zingiberensis*；RAPD；Genetic diversity；Genetic structure

---

* **基金项目：国家自然科学基金项目**（30270108）**及江苏省科技攻关项目**（BE2001356）

** **通讯作者** Tel：(025) 4347052，E－mail：hangyueyu@21cn.com

收稿日期：2003－05－06，2003－08－05 **接受发表**

作者简介：黄春洪（1979－）**男，硕士研究生，主要从事植物遗传多样性研究。**

盾叶薯蓣（*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright.）是我国特有植物，隶属薯蓣属根状茎组。其根茎中含有薯蓣皂苷元（diosgenin），是提取和合成激素类药物和避孕药的重要原料。研究表明：盾叶薯蓣单株的薯蓣皂苷元最高含量为16.5%，超过了几种国外的高含量薯蓣，如墨西哥的小穗花薯蓣（*D. spiculiflora* Hemsl.）（含量为15%）、菊叶薯蓣（*D. composita* Hemsl.）（含量为13%），南非的森林薯蓣（*D. sylvatica* Ecklon）（含量为5.7%），印度的三角叶薯蓣（*D. deltoidea* Wall.）（含量为5.8%）等，是目前世界上单株薯蓣皂苷元含量最高的薯蓣种（丁志遵等，1983）。近20年来，随着对薯蓣皂苷元需求的增大，野生盾叶薯蓣被大量采挖，资源破坏严重，造成了许多优良性状的丧失（遗传衰退），薯蓣皂苷元含量逐年下降。资源调查表明：上世纪60年代末在整个盾叶薯蓣分布区，其总蕴藏量约为6万吨，湖北产区约为3.5万吨，而据2001年的资源调查结果，整个秦巴-武当山地区的野生盾叶薯蓣储量仅为4695.1吨，乱采滥挖已使该资源濒临绝境（袁晓颖等，2003）。盾叶薯蓣作为我国的一个特有种，同时还是一个狭域种，其分布范围为东经104°53′~112°50′，北纬23°42′~34°10′，即秦岭以南，南岭以北的米仓山、大巴山、武陵山、雪峰山和衡山等山区以及长江中上游及其支流的低中山丘陵，垂直分布在海拔100~1 500 m的河谷、山地，落叶阔叶与常绿落叶阔叶混交林的边缘或稀疏的常绿灌木林内（丁志遵等，1983）。特殊的分布范围和生长环境使得这种植物在自然界中处在一种弱势状态，其资源量恢复非常缓慢（丁志遵等，1983）。因此，随着人们对资源的掠夺和对生境的破坏，野生盾叶薯蓣居群数目和居群规模在不断变小，生境也逐渐片断化，物种基因库迅速萎缩，遗传多样性下降。对物种居群的遗传结构和变异水平的研究有助于我们有效地保护和利用这种重要的中药资源，同时也有助于我们探索盾叶薯蓣的遗传特性及其生存环境与薯蓣皂苷元含量的关系。

RAPD指纹能极其明显地揭示两个亲缘关系十分相近的个体之间的遗传变异，因此它适合于检测种下水平的多样性：包括野生植物天然居群的遗传结构分析，种质资源的评估，栽培植物品种的鉴定等（邹喻苹等，2001）。本文利用RAPD标记对我国盾叶薯蓣分布区的11个居群的遗传多样性进行检测，结合各居群的种质分析结果，提出高含量、高产量野生盾叶薯蓣保护策略的建议，并为杂交育种中亲本选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料采自我国盾叶薯蓣分布区的11个居群，见图1。

1.2 分子标记

1.2.1 **基因组DNA的提取** 每个居群取8个个体，共82份（由于分雌雄株取样，保康和永顺居群分别仅取4株和6株），每一个体取2~3片新鲜幼嫩的叶片，用CTAB法（Paterson等，1993）提取总DNA，最后溶解在TE缓冲液中。

1.2.2 **RAPD的PCR扩增与检测** DNA扩增在PE-9600型PCR仪上进行，反应条件参Ramser等（1996）：25 μl的反应液含有20 mmol/L Tris-HCl（pH 8.4），50 mmol/L KCl，dNTPs分别0.2 mmol/L，0.8 μmol/L引物，100 ng模板DNA，0.06 U/μl Taq酶。PCR反应条件：94℃ 1 min预变性后，94℃变性30 s，35℃退火30 s，72℃延伸90 s，3个循环；再94℃变性15 s，35℃退火30 s，72℃延伸90 s，38个循环，最后72℃保温150 s。PCR扩增产物在1.6%琼脂糖凝胶中电泳，溴化乙锭染色，在紫外透射仪上成像，记录实验结果。

图 1　盾叶薯蓣的分布区和样品采集点（参 丁志遵等，1983）

Fig. 1　Distribution area of *D. zingiberensis* and sampling places in China（Cited from Ding *et al*，1983）

1.3　引物筛选

筛选了上海生物工程技术有限公司生产的 RAPD 引物共 40 个，选择扩增条带丰富、信号强的 15 个引物进行 RAPD 正式实验。正式使用的引物序列及扩增结果见表 2。

1.4　数据分析

根据 DNA 条带的有无将 RAPD 扩增后的电泳结果转化为二元数据矩阵（有带的赋值为 1，无带的为 0)。根据多态性 DNA 条带计算各居群的多态性和物种水平的多态性。应用 POPGEN32 软件（Yeh 等，1994）计算有效等位基因数（N_e），Nei's 基因多样性（h）和 Shannon 多样性指数（I），UPGMA 法对各居群间亲缘关系作系统树图。居群内单株、居群间和地区间的变异通过 AMOVA 程序（Excoffier，1993）计算（钱韦和葛颂，2001；朱其慧等，2002；张富民和葛颂，2002)。此外，基于等位基因频率，利用 POPGENE 计算物种的基因分化系数（G_{st}）和基因流（N_m）。

2　结果

2.1　PCR 扩增结果

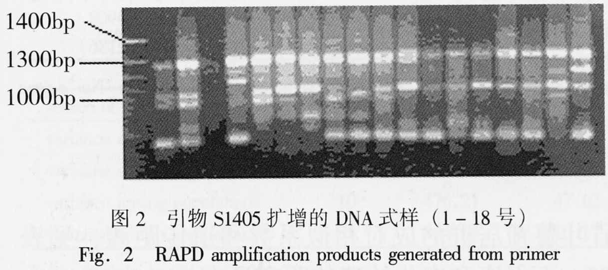

图 2　引物 S1405 扩增的 DNA 式样（1 - 18 号）

Fig. 2　RAPD amplification products generated from primer S1405（accessions no. 1 - 18）

15 个随机引物共扩增出 108 条带，其中 96 条为多态带，多态百分率（PPB）为 88.89%。每个引物扩增出 5 ~ 10 条带，其中引物 S1212、S1376、S1399、S1404 和 S1456 扩增结果全部为多态性带（表 1)。图 2 显示了引物 S1405 扩增的部分 DNA 条带式样。

2.2　居群遗传多样性

表 1　供试随机引物及扩增结果

Table 1　RAPD primers and amplified results

NO.	Primer	Sequence（5′－3′）	Total sites	Polymorphic sites
1	S1208	CTGAATGCGG	5	4
2	S1211	GGGAAGACGG	6	5
3	S1212	GGATCGTCGG	5	5
4	S1213	GGGTCGGCTT	7	5
5	S1216	TGGGGCTCAA	8	7
6	S1371	TCCAGCGCGT	9	8
7	S1376	AGGCGAACTG	7	7
8	S1399	TGAGGCGTGT	8	8
9	S1402	GGAAACCCCT	8	7
10	S1404	GGCACGCGTT	10	10
11	S1405	CCCGAAGCGA	9	8
12	S1409	GGGCGACTAC	6	4
13	S1456	AACGGGCGTC	7	7
14	S1458	ACGAGAGGCA	8	7
15	S1459	CTTGGCACGA	5	4
Total			108	96

盾叶薯蓣各居群的遗传多样性和分化指数见表 2。根据 PPB 值，各居群遗传变异由高向低为：安康居群 > 营山 > 马道 > 郧西 > 永顺 = 宜昌 > 安化 > 云阳 = 万源 > 武当山 > 保康。而根据 *I* 值各居群遗传多样性高低排列为：永顺 > 安康 > 营山 > 安化 > 郧西 > 宜昌 > 马道 > 云阳 > 武当山 > 万源 > 保康。Shannon 多样性指数（*I*）变化范围为 0.1564 至 0.3098，物种水平多样性为 0.3093，Nei 基因多样性从 0.1607 到 0.2137，物种水平为 0.2499。保康居群为多年栽培，多样性条带和 Shannon 指数均最低。

表 2　盾叶薯蓣的遗传多样性

Table 2　Genetic diversity among the 11 populations of *D. zingiberensis*

Population	Npb	PPB%	*ne*	*h*	*I*
Yichang	56	51.85	1.2910	0.1725	0.2610
Wudangshan	50	46.30	1.2565	0.1529	0.2319
Baokang	29	26.85	1.1864	0.1067	0.1564
Yunxi	57	52.78	1.2985	0.1759	0.2657
Ankang	66	61.11	1.2984	0.1855	0.2873
Madao	60	55.56	1.2610	0.1624	0.2530
Wanyuan	51	47.22	1.2154	0.1328	0.2076
Yingshan	63	58.33	1.3022	0.1823	0.2792
Yunyang	51	47.22	1.2573	0.1545	0.2349
Yongshun	56	51.85	1.3879	0.2137	0.3093
Anhua	53	49.07	1.3262	0.1829	0.2690
Species	96	88.89	1.4022	0.2499	0.3908
St. Dev.			(0.3261)	(0.1630)	(0.2186)

Note：Npb：Number of polymorphic bands；PPB：percentage of polymorphic bands；*ne*：effective number of alleles；*h*：Nei's gene diversity；*I*：Shannon's information index

2.3　遗传距离和聚类分析

由 RAPD 分子标记数据计算的 11 个盾叶薯蓣居群的成对相似系数和遗传距离，见表 3。其中安康、马道遗传距离最短为 0.0303，而保康和安化的遗传距离最大为 0.2590。

表 3 居群间遗传相似系数和遗传距离

Table 3 Similarity coefficient and Nei 's genetic distance of 11 *D. zingiberensis* populations

Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	0.9351	0.8844	0.9068	0.9426	0.9557	0.9419	0.9261	0.8957	0.9228	0.8639
2	0.0671	****	0.8995	0.9438	0.9248	0.9484	0.9407	0.9133	0.8730	0.8900	0.8217
3	0.1228	0.1059	****	0.9241	0.9051	0.9203	0.8960	0.8610	0.8122	0.8157	0.7718
4	0.0979	0.0579	0.0790	****	0.9360	0.9517	0.9116	0.9142	0.8656	0.8437	0.8075
5	0.0591	0.0782	0.0997	0.0661	****	0.9701	0.9243	0.9314	0.8816	0.8856	0.8525
6	0.0453	0.0529	0.0831	0.0495	0.0303	****	0.9625	0.9516	0.8994	0.8868	0.8542
7	0.0598	0.0611	0.1099	0.0926	0.0788	0.0383	****	0.9406	0.8906	0.9131	0.8579
8	0.0768	0.0907	0.1497	0.0897	0.0711	0.0496	0.0612	****	0.9235	0.9170	0.8734
9	0.1102	0.1359	0.2080	0.1444	0.1261	0.1060	0.1159	0.0796	****	0.9149	0.8874
10	0.0803	0.1165	0.2037	0.1699	0.1215	0.1201	0.0910	0.0867	0.0889	****	0.9137
11	0.1463	0.1964	0.2590	0.2138	0.1596	0.1576	0.1533	0.01354	0.1194	0.0708	****

Note：1 – 11 represent population of Yichang，Wudangshan，Baokang，Yunxi，Ankang，Madao，Wanyuan，Yingshan，Yunyang，Yongshun，Anhua，respectively.

Nei 's genetic identity（above diagonal）and genetic distance（below diagonal）.

图 3 11 个盾叶薯蓣居群的聚类图

Fig. 3 Dendrogram of different *D. zingiberensis* populations by clustering analysis

根据Nei 's 遗传距离，得到 11 个居群的聚类图，见图 3。

11 个居群聚类结果表明：居群间的遗传距离呈现明显的地域性，居群间地理距离越近，遗传距离越小而聚为一类，如安康和马道，武当山和郧西，永顺和安化等。栽培居群（保康）单独成为一支。根据居群的聚类结果，大致的可以将我国的盾叶薯蓣分为两个大类群：南方类群和北方类群。南方类群即云阳（盾叶薯蓣样品采自于长江南岸）、永顺和安化居群代表的湖南，湖北西南部，重庆，四川东南部；北方类群包括宜昌、秦巴 – 武当山地区，四川万源、营山居群等。长江可能在南北两个大类群的分化中起地理隔离作用。

2.4 群体遗传分化

以 AMOVA 进行的遗传变异巢式方差分析和用 POPGENE 计算的分化系数见表 4 和表 5。

从表 4 看，以地区为单位时，地区间的变异占总变异的 18.35%，以群体为单位时，群体间的变异占 29.45%，70.55%的变异分布于居群内，遗传变异大部分存在居群内。

表 4 盾叶薯蓣群体分化的分子方差分析

Table 4 RAPD-based molecular variance analysis（AMOVA）for *D. zingiberensis* populations

source of variance	*d.f*	SS	MS	variance component	percentage	*P-value* *
variance among regions	1	226.62	226.62	3.09	18.35	< 0.001
variance within regions	3	1073.64	357.88	13.76	81.65	< 0.001
variance among populations	10	476.21	47.62	4.86	29.45	< 0.001
variance within populations	81	824.04	10.17	11.61	70.55	< 0.001

* Significance tests after 1 000 permutations.

d.f：degree of freedom；SS：sum of squares；MS：mean squares；*P-value*：probability of null distribution.

表 5 盾叶薯蓣基因分化系数

Table 5 Coefficient of gene differentiation of *D. zingiberensis* populations

	H_t	H_s	G_{st}	N_m
Species	0.2516	0.1656	0.3415	0.9641

H_t：gene diversity of species；H_s：gene diversity within populations；G_{st}：coefficient of gene differentiation；N_m：gene flow.

用 POPGENE 在假设遗传平衡条件下对所有的 11 个居群进行分析，计算出的基因分化系数 G_{st} 为 0.3415，即在总的遗传变异中有 34.15%存在于群体间，比 AMOVA 的分析结果略高。基因流为 0.9641，说明居群间的遗传交换较少，这与薯蓣属的生物学性质有关。

3 讨论

通过对 11 个居群盾叶薯蓣的 RAPD 分析，可以看出盾叶薯蓣的遗传结构及分化与其生物学性质有密切关系，分析原因如下。

3.1 居群间基因分化

基因分化系数 $G_{st}=0.3415$，说明 34.15%的遗传变异存在于居群之间，65.85%的变异存在于居群内，该结果与 AMOVA 计算的结果一致。这可能是因为盾叶薯蓣雌雄异株，是典型的远交植物，自交很少发生。参考 Hamrick 和 Godt（1990）对种子植物 165 属 449 种植物的统计结果，单子叶植物 G_{st} 为 0.231，特有种为 0.248，狭域种为 0.242。盾叶薯蓣基因分化系数比平均结果高。

朱其慧等（2002）用 RAPD 标记对栲树（*Castanopsis fargesii* Franch）的基因流估测，N_m 值为 11.2635。而盾叶薯蓣居群间基因流 $N_m=0.9641$，说明盾叶薯蓣居群间遗传交换很弱，可能有如下原因：（1）基因流主要通过种子、花粉两种形式发生，盾叶薯蓣种子和花粉传播距离有限，野生状况下盾叶薯蓣种子的萌发率很低，而盾叶薯蓣花较小，其传粉媒介是一些飞行能力有限或者无飞行能力的小型昆虫。（2）生境的片断化、居群数目及规模的下降，使居群间的基因交流以很小的几率发生。此外，天然的物理屏障（如江河）也是造成盾叶薯蓣居群间基因流估测值偏低的原因。

3.2 盾叶薯蓣类群分化原因

居群的聚类结果支持以长江为界线，把盾叶薯蓣分布区分为南北两个大类群。有两个方面的原因：（1）盾叶薯蓣居群间通过种子和花粉发生的基因流比较微弱。（2）地理隔离或物理屏障在种群的分化和种群间的遗传交流中的重要作用。Su 等（2003）对居庸关长城 6 种植物居群的遗传多样性及其遗传结构分析发现，长城有阻碍基因交流作用，被长城隔离的植物有明显的差异。相对于存在时间仅有 2000 多年的长城而言，长江更是植物种群间基因交流的一道天然屏障，削弱了长江两岸植物种群基因流的发生。这两个原因造成长江南北盾叶薯蓣由于缺乏有效基因交流，在漫长的生物演化中两者的遗传距离越来越远，从而导致种内的分化。

3.3 盾叶薯蓣迁地保护的建议

在种质资源的保护和利用中，建立“核心种质”（core collection）是一个提高种质资源管理质量和效率的重要途径（Virk，1995）。对于一个基因流（N_m）比较小，G_{st} 值为 0.60 的物种，至少要取样 6 个居群才能保存其 95%的遗传多样性；而对 G_{st} 值为 0.20 的物种，要达到同样的效果这只需要取样 2 个居群就足够（Hamrick 等，1991）。根据盾叶薯蓣 G_{st}

值，我们认为只要保存永顺、安康、营山等几个遗传多样性高的居群就可以保存盾叶薯蓣的种质多样性。

致谢　感谢江苏农科院遗传所陆维忠研究员，张旭老师提供实验条件和指导；感谢中科院北京植物所朱其慧，张富民博士帮助分析数据！

〔参　考　文　献〕

丁志遵，唐世蓉，秦慧贞等，1983．**甾体激素药源植物**［M］．**北京：科学出版社，**31—32

Excoffier L，1993．Analysis of Molecular Variance（AMOVA）Version 1.5．Genetics and Biometry Laboratory．University of Geneva

Hamrick JL，Godt MJW，1990．Allozyme diversity in plant species ［A］．In：Brown AHD，Clegg MT，Kahler AL *et al*．（eds）Plant Population Genetics，Breeding and Genetic Resources ［M］．Sunderland：Sinauer，43—63

Hamrick JL，Godt MJW，Murawski SA，*et al*．1991．Correlations between species traits，allozyme diversity：implications for conservation biology ［A］．In Falk DA，Holsinger DE．（eds）Genetics，Conservation of Rare Plants ［M］．New York：Oxford University Press，75—86

Paterson AH，Brubaker CL，Wendel JF，1993．A rapid method for extraction of cotton（*Gossypium* spp.）genomic DNA suitable for RFLP of PCR analysis ［J］．*Plant Mol Bio Rep*，**11**（3）：122—127

Qian W（**钱韦**），Ge S（**葛颂**），2001．Analysis of population genetic structure by using dominant markers ［J］．*Acta Genet Sin*（**遗传学报**），**28**（3）：244—255

Ramser J，Cristina LP，Wetzel R，*et al*，1996．Genomic variation and relationships in aerial yam（*Dioscorea bulbifera*）detected by random amplified polymorphic DNA ［J］．*Genome*，**39**（1）：17—25

Su H，Qu LJ，He K，*et al*，2003．The Great Wall of China：a physical barrier to gene flow ［J］？*Heredity*，**90**：212—219

Virk PS，Newbury HJ，Jackson Mt，1995．The identification of duplicate accession within a rice germplasm collection using RAPD analysis ［J］．*Theor Appl Genet*，**90**：1049—1055

Yeh FC，Yang R，1994．POPGENE v 1.31，download from http：//www.ualberta.ca/～fyeh/．

Yuan XY（**袁晓颖**），Zu YG（**祖元刚**），Yu JH（**于景华**），2003．An evaluation to resources stories of *Dioscorea zingiberensis* C．H．Wright in China ［J］．*Bull Bot Res*（**植物研究**），**23**（1）：103—105

Zhang FM（**张富民**），Ge S（**葛颂**），2002．Data analysis in population genetics．Ⅰ．analysis of RAPD data with AMOVA ［J］．*Biodiver Sci*（**生物多样性**），**10**（4）：438—444

Zhou YP（**邹喻苹**），Ge S（**葛颂**），Wang XD（**王晓东**），2001．Molecular Marker in Systematic and Evolution Botany（**系统与进化植物学中的分子标记**）［M］．Beijing：Science Press

Zhu QH（**朱其慧**），Pan HX（**潘惠新**），Zhu GQ（**诸葛强**），*et al*，2002．Analysis of genetic structure of natural populations of *Castanopsis fargesii* by RAPDs ［J］．*Acta Bot Sin*（**植物学报**），**44**（11）：1321—1326